

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-100331

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月13日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 47/30

A 6 1 K 47/30

B

9/107

9/107

F

31/70

31/70

審査請求 未請求 請求項の数 9 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平9-279941

(22) 出願日 平成 9 年(1997) 9 月26日

(71) 出願人 597144679

ナノキャリア株式会社

東京都世田谷区用賀 4-5-16

(72) 発明者 片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4

(72) 発明者 岡野 光夫

千葉県市川市国府台 6-12-12

(72) 発明者 グレン・エス・クウォン

アメリカ合衆国ウイスコンシン州53719マ

デイソン・ティンバーレイクトレイル101

7362

(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物含有ポリマーミセルおよびその医薬製剤

(57) 【要約】

【課題】 毒性の低減したポリエン系抗生物質の医薬製剤の提供。

【解決手段】 製剤用担体として、ポリ(エチレンオキシド)-ブロック-ポリ(β-アルキルもしくはアラキル-L-アスパルテート)およびポリ(エチレンオキシド)-ブロック-ポリ(γ-アルキルもしくはアラキル-L-グルタメート)からなる群より選ばれるブロックコポリマーのポリマーミセルを用いる。

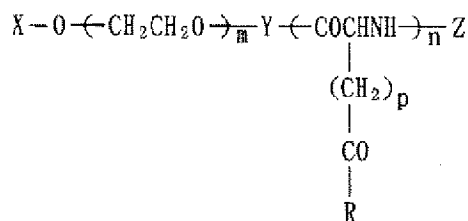
【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬物を含有するポリマーミセルであって、
薬物がポリエーテル系抗生物質であり、
ポリマーがポリ（エチレンオキシド）-ブロック-ポリ（β-アルキルもしくはアラキルL-アスパルテート）およびポリ（エチレンオキシド）-ブロック-ポリ（γ-アルキルもしくはアラキルL-グルタマート）よりなる群から選ばれるブロックコポリマーであり、そして、ポリエーテル系抗生物質が前記ブロックコポリマーのポリマーミセル内に閉じ込められている、ことを特徴とするポリマーミセル。

【請求項2】 ポリエーテル系抗生物質が単量体の形態でポリマーミセル内に閉じ込められている請求項1記載のポリマーミセル。

【請求項3】 ポリマーが下記一般式：

【化1】



（上式中、Xはポリ（エチレンオキシド）ブロックを誘導するためのイニシエーターに由来する基であり、Yはポリ（β-アルキルもしくはアラキルL-アスパルテート）またはポリ（γ-アルキルもしくはアラキルL-グルタマート）を誘導するためのイニシエーターとして作用する基であり、Zは水素原子またはアミノ保護基であり、Rはアルキル基またはアラキル基であり、mおよびnは独立して、2～10,000のいずれかの整数であり、そしてpは整数1または2である）で表される請求項1または2のいずれかに記載のポリマーミセル。

【請求項4】 ポリエーテル系抗生物質がアムホテリシンB（AmB）であり、そしてポリマーがポリ（エチレンオキシド）-ブロック-ポリ（β-ベンジルL-アスパルテート）である請求項1～3のいずれかに記載のポリマーミセル。

【請求項5】 ポリマーミセルの平均粒径が5nm～1000nmである請求項1～4のいずれかに記載のポリマーミセル。

【請求項6】 ポリマーに対する薬物のモル比が1以下である請求項1～5のいずれかに記載のポリマーミセル。

【請求項7】 有効成分として、請求項1～6のいずれかに記載のポリマーミセルが凍結乾燥された状態で含まれている医薬製剤。

【請求項8】 有効成分として、請求項1～6のいずれ

かに記載のポリマーミセルが水性媒体に溶解もしくは分散された状態で含まれている医薬製剤。

【請求項9】 薬物が10μg/ml～5.0mg/mlの濃度範囲にある請求項8記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は薬物を含有するポリマーミセルおよびその医薬製剤に関し、より具体的にはポリエーテル系抗生物質の毒性を低減できるポリマーミセルに関する。

【0002】

【発明の背景】ポリエーテル系抗生物質（またはポリエーテルマクロライド類）は、真菌その他の真核細胞の細胞膜ステロールと結合して膜流動性を変化させる結果、膜に障害を与える作用を有することが知られている。そして、真菌特有のエルゴステロールに対して選択性の高い親和性をもつものは抗真菌剤として使用されている。なかでも、最も選択毒性にすぐれており、ポリエーテル系抗生物質の典型的な化合物であるアムホテリシンB（以下、AmBともいう）について、以下に概観してみる。

【0003】AmBは、広域抗真菌性薬物であり、全身性真菌疾患の治療に使用されている。免疫無防備状態（易感染性）宿主では、これらの疾患は死をもたらす主たる原因であり、さらにAIDSならびにガン治療や臓器移植等における攻撃的化学療法に付随して増加してきた疾患でもある。AmBは30年間以上も使用されており、新たな抗真菌剤が開発されているにもかかわらず、いまだ全身性真菌疾患用の薬物として選択されている。たとえば、AmBとデオキシコール酸塩との複合体の水溶性溶液〔たとえば、Fungizone（商標）、Bristol-Myers Squibb〕は深在性真菌症を治療するための注射剤として使用されている。

【0004】しかしながら、AmBの特定の製剤は全身性真菌疾患治療薬として繁用されているものの、毒性、特に腎毒性が強く、その上、一般的な倦怠感、貧血および静脈炎を惹起することも知られている。また、AmBは水不溶性であり、希釈剤や輸液におけるその沈殿は急性毒性に関連する可能性もある。このような観点から、AmBの化学的な修飾により、その水溶性を高めることが試みられているが、毒性を低減することに成功していない。

【0005】したがって、AmBを薬物担体で包み込むことにより、AmBの効能を改善すべく精力的な研究が行われている。特に、この10年間、脂質をベースとするAmB用担体が広範に検討され、それらのある種のは、AmBの抗菌活性を維持したまま、その毒性を低減することにある程度成功している。このような製剤におけるAmBの毒性が低減される理由は不明であるが、腎におけるAmB濃度が低いことが明らかにされている

[J. Bratburg, et al., Clin. Microbiol. Rev. 9

(1996) p p. 512-531参照]。その他の提案されているAmBの製剤は、水中油乳濁質もしくは洗剤のミセル系である。たとえば、C. Tasset, et al., J. Pharm. Pharmacol. 43 (1991) p p. 297-302には、ポリオキシエチレングリコール (POE) 誘導体の混合ミセルを担体に使用した例が記載されている。この報告によると、コレステロールのPOE誘導体は、AmBを可溶化し、*in vitro* でのAmBの抗真菌活性を変化させることなく、*in vitro* および *in vivo* でのAmBの毒性を低減でき、そしてステアリン酸のPOE誘導体もAmBを可溶化し、かつ溶血活性を低減できることが教示されている。また、J. Barwicz, et al., Antimicrob. Agents Chemother., 36 (1992), p p. 2310-2315には、担体として、上記デオキシコル酸ナトリウムを用いる Fungizone (商標) の高い毒性はAmBの凝集 (または自己会合) に起因する可能性があり、一方ラウリルスクロース (LS) を担体として用い、LS対AmBの混合モル比を選ぶ (例、LS/AmB 約50) と、AmBが媒体中で殆ど単量体性の形態で存在し、AmBの毒性が低減することが示唆されている。

【0006】以上のように、AmB製剤のいくつかはAmBの毒性を低減することに成功しているが、高レベルでAmBを含有でき、しかも物理的に安定なAmB製剤の提供には、必ずしも成功していない。

【0007】一方、他の薬物の製剤に使用されている担体のうち、興味深いものについて概観してみる。

【0008】本発明者らは、薬物の可溶化および送達用の担体として、ポリマーミセルの使用を研究してきた

[K. Kataoka, et al., J. Controlled Release 24 (1993) p p. 119-132; G. S. Kwon, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16 (1995) p p. 259-309、他]。これらの論文によると、シェル形成性ポリ (エチレンオキサイド) (以下、PEOともいう) ブロックと生分解性ポリマーであるコア形成性ポリ (L-アミノ酸) ブロックからなるジブロックコポリマー由来のポリマーミセルは、ナノサイズのコア/シェル構造をとり、疎水性薬物、ビレン、ドキシソルピシン [アドリアマイシン (ADM) とも称されている] およびインドメタシンを可溶化することが教示されている。

さらに、それらの論文には、コア形成性ブロックであるポリ (L-アミノ酸) をL-アスパラギン酸で構築し、そのβ-カルボキシル基を介してADMを共有結合せしめたコンジュゲート (Conjugate) 型のポリマーミセルは、生体内での薬物の吸収、排泄、および組織 (または器官) の選択性において極めて興味深い性質を示すことも記載されている。G. S. Kwon, et al., Pharmaceutical Research, 12 (1995) p p. 192-195には、上記のような薬物が結合されたミセルとは異なり、L-アスパラギン酸由来のブロックをポリ (β-ベ

ンジルL-アルバルテート) (以下、PBLAともいう) で構築したPEO-PBLAのポリマーミセルがADMを物理的に安定にミセル内に閉じ込めることができ、しかもADMの薬物動態に著しく影響を及ぼしうることも記載されている。その上、この文献には、ADMがミセル内で自己会合していることも示唆されている。

【0009】

【発明の構成】上記したように、脂質のリボソームまたは洗剤の混合ミセルを利用したAmB製剤が提供され、AmB自体の毒性を低減できることが報告され、それらの一部は臨床で使用されている。しかし、毒性を低減する一方で、製剤における薬物含有率を高め、しかも物理的に安定なAmB製剤の提供については、依然として強い要望がある。

【0010】本発明者らは、かような要望を満たすために、上記のようなポリマーミセル系が担体として使用できるかについて、鋭意検討してきた。その結果、構造上AmBは、アントラサイクリン系抗生物質ADMとは明確に区別され、特に、両親媒性を示すような特異な物質を有するにもかかわらず、PEO-PBLAからなるブロックコポリマー由来のポリマーミセル中へ安定に閉じ込められ、こうして得られる薬物含有ポリマーミセルは薬物の徐放性を示すことが確認された。

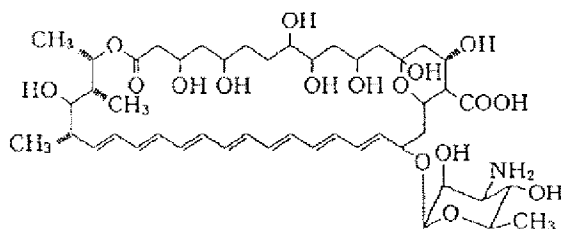
【0011】ところで、ADMはPEO-PBLAミセル中で自己会合することが知られている (上記、Kwon, et al., Pharmaceutical Research, 12 (1995) p p. 192-195参照) にもかかわらず、AmBを充填したPEO-PBLAミセルは、AmBを単量体の形態でミセル内に担持し、そして放出することができ、しかもAmBの毒性を有意に低減できることが、ここに見出された。この毒性の低減は、AmBの高い毒性がAmBの自己会合物に起因するとの示唆がある (上記、J. Barwicz, et al., Antimicrob. Agents Chemother., 36 (1992) p p. 2310-2315参照) ことを考慮すれば理解できるであろう。さらに、このようなAmBとPEO-PBLA混合ミセル系の挙動は、AmBを初めとする広範なポリエン系抗生物質とPEO-ポリ (β-アルキルもしくはアラルキルL-アスパルテート) またはPEO-ポリ (γ-アルキルもしくはアラルキルL-グルタメート) 系でも再現できる。

【0012】したがって、本発明によれば、薬物を含むポリマーミセルであって、薬物がポリエン系抗生物質であり、ポリマーがポリ (エチレンオキシド) - ブロッカーポリ (β-アルキルもしくはアラルキルL-アスパルテート) およびポリ (エチレンオキシド) - ブロッカーポリ (γ-アルキルもしくはアラルキルL-グルタメート) よりなる群から選ばれるブロックコポリマーであり、そしてポリエン系抗生物質が、好ましくは単量体の形態で前記ブロックコポリマーのポリマーミセル内に閉じ込められている、ことを特徴とするポリマーミセル

が提供される。かようなポリマーミセルは水性溶液中で濾過滅菌できる程安定であり、ポリマーミセルのコアから、長期にわたって薬物をその活性を保持したまま徐々に放出し、その上、極めてサイズ分布の狭いナノサイズの粒状物として提供できるので、それらのポリマーミセルの水性溶液もしくは分散体は、そのまま医薬製剤として使用できる。

【0013】また、本発明に従う薬物含有ポリマーミセルは凍結乾燥された形態においても安定しており、そのまま他の医薬成分と混合することができ、またこの凍結乾燥体を水性媒体にもどすことで出発ポリマーミセルと同等の挙動を示すポリマーミセル溶液（または分散体）に再構成することもできる。こうして再構成される溶液は高い薬物含有量で安定に維持することもできる。

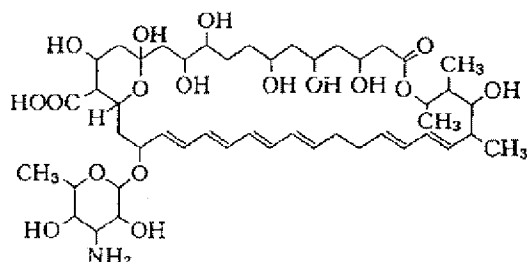
【0014】したがって、別の態様の本発明としては、



【0018】で表されるアムホテリシンB（AmB）、下記式

【0019】

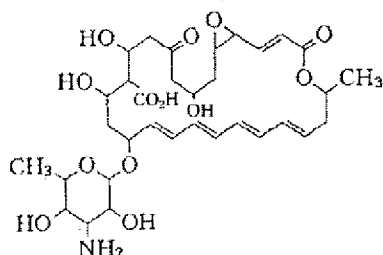
【化3】



【0020】で表されるナイスタチン、下記式

【0021】

【化4】



【0022】で表されるビマリジン、下記式

【0023】

【化5】

有効成分として前記薬物含有ポリマーミセルが凍結乾燥状態で含まれている医薬製剤が提供される。

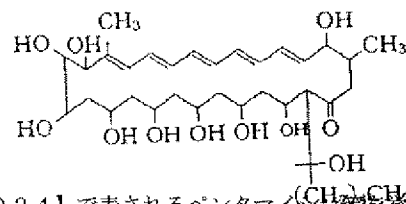
【0015】さらなる態様の本発明としては、有効成分として前記薬物含有ポリマーミセルが水性媒体に溶解もしくは分散された状態で含まれている医薬製剤も提供される。

【0016】

【本発明の具体的な記述】本発明に従うポリマーミセル内に閉じ込められる薬物には、本発明の目的に沿う限り、ポリエーテル系抗生物質に属するいかなる化合物も包含される。ポリエーテル系抗生物質の具体的なものとしては、下記式

【0017】

【化2】



【0024】で表されるペンタマイシン等を挙げるができる。特に、最も選択毒性にすぐれるAmBに関するポリマーミセルが好適である。

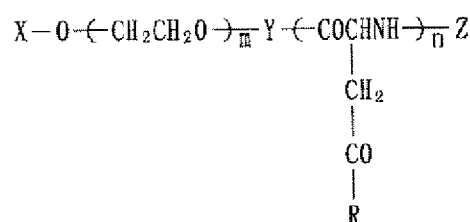
【0025】本発明で用いることのできるポリマーは、AB型ブロックコポリマーに属し、ポリマーブロックがポリ（エチレンオキシド）とポリ（ β -アルキルもしくは γ -アルキルL-アスパルテート）またはポリ（ γ -アルキルもしくは α -アルキルL-グルタメート）からなる。L-アスパルテートまたはL-グルタメートにおけるアルキルもしくは α -アルキル基は、上記薬物を閉じ込め、それらをゆっくり放出できるものであればいかなる基であってもよい。かようなアルキル基の具体的なものとしては、直鎖もしくは分岐の C_{1-20} アルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、*iso*-プロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ヘキシル、オクチル、デカニル、ウンデカニル、テトラデカニル、ヘキサデカニル、オクタデカニルおよびエイコサニルを挙げることができ、これらのうち一定の高さを有する*tert*-ブチル、オクチルテトラデカニル、ヘキサデカニルを好ましいものとして挙げるができる。アルキル基は、 C_{1-3} アルキル基の水素原子が1もしくは2以上のアリール基で置換された基であって、特にベンジ

ル、ベンズヒドリルを代表的なものとして挙げることができる。これらのアルキルおよびアラルキル基のうち、特に好ましいものはベンジル基である。一方、アミノ酸に由来するブロックは、ポリ(L-アスパルテート)がより安定なポリマーを与えるので好ましい。

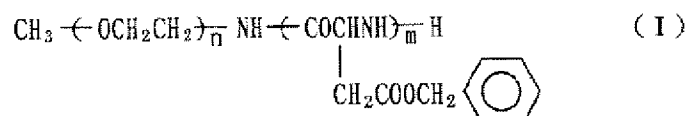
【0026】したがって、本発明において、ポリ(エチレンオキシド)-ブロック-ポリ(β-アルキルもしくはアラルキルL-アスパルテート)または-ポリ(γ-アルキルもしくはアラルキルL-グルタメート)の好ましいものは、上述のPEO-PBLAからなるブロックコポリマーである。以下、本発明で使用するAB型ブロックコポリマーは、PEO-PBLAからなるブロックコポリマーを引用して説明する。なお、「PEO-PBLAからなる」という「からなる」とは、下記一般式：

【0027】

【化6】



【0028】で表され、すなわち、PEO-PBLAの両末端または片末端に、あるいはPEOとPBLAとの間に、本発明に従うポリマーミセルを形成する際に、悪



【0032】で表されるPEO-PBLAのPEOブロックが約12,000g/mol (m=約270)となり、PBLAブロックが約3,000g/mol (n=約12)となるように、nおよびmが一定の整数をとる場合、このようなブロックコポリマーの薬物含有ポリマーミセルは、約20nm~約30nmの平均粒径をとる。本発明に従う、ポリマーミセルの平均粒径は、ミセルを構築するブロックコポリマーの種類およびその量に応じて変動し、平均約5~nm~約1000nm、好ましくは約10nm~約500nm、より好ましくは約20nm~約100nmを有する。

【0033】このような薬物含有ポリマーミセルは、AmB/PEO-PBLAのモル比を、1.0以下とすることができ、製剤中の薬物含有密度は可能な限り高い方が望ましいが、そのモル比が1を超えると Fungizone (商標)のように溶血活性を示すこともあるので注意が必要であろう。

【0034】以上のように、本発明に従う、薬物含有ポリマーミセルは、ナノサイズのコア/シェル構造をとり、濾過滅菌ができる物理的な安定性を有している。ま

影響を及ぼさないどのような基が共有結合してもよいことを意味する。具体的には、PEOの末端には、エチレンオキシドを重合する際に使用されるイニシエーター由来の基または水酸基の保護基(上記式中のXに対応する)、たとえばアセタールが結合していてもよく、またPEOとPBLAの間には、PEOブロックを形成するとともに、PBLAブロックを形成するためのイニシエーターとして作用しうるように、たとえばイミノ基(-NH-) (上記式中のYに対応する)が存在していてもよい。さらに、PBLAの末端のβ-ベンジルアスパルテートのアミノ基はペプチド合成の分野で使用されるような、いずれかのアミノ保護基(上記式中のZに対応する)により保護されていてもよい。なお、かような保護基を有しない場合、Zは水素原子を示す。

【0029】PEO-PBLAの各ブロックにおけるPEOおよびPBLAの分子量は、それらがポリマーミセルを形成しうるものであればどのような範囲にあってもよい。したがって、限定されるものでないが、mは、2~10,000、好ましくは20~1,000、より好ましくは40~400のいずれかの整数である。一方、nは、2~10,000、好ましくは20~1,000、より好ましくは10~100のいずれかの整数である。

【0030】たとえば、式(I)：

【0031】

【化7】

た、理論により拘束されるものでないが、本発明の薬物含有ポリマーミセルは薬物が、好ましくは単量体の形態のまま充填された(または閉じ込められた)コアが親水性シェルによりマスクされている点に特徴がある。さらに、これらのミセルは極めて安定であるにもかかわらず、徐々に個々のポリマー、さらにはモノマーに解裂されうる[上記、K. Kataoka, et al., G. S. Kwon, et al., 参照]。

【0035】その上、本発明に従う、薬物含有ポリマーミセルは、水性環境下に置いたとき、そのコアから薬物を単量体の形態で徐々に放出することができる。

【0036】本発明に従う、薬物含有ポリマーミセルのさらなる特徴は、凍結乾燥したものが水溶液中に数秒間で容易に溶解できる特性をもつことにある。たとえば、PEO-PBLAもAmBも、個別に水溶液中に置いた場合、両者とも水に難溶性であることを考慮すれば、本発明に従う、凍結乾燥された薬物含有ポリマーミセルは極めて特異な性質を示すといえる。こうして、凍結乾燥ポリマーミセルを使用すれば、高濃度のAmB溶液を得ることが可能になる。たとえば、水溶液中のAmB濃度は

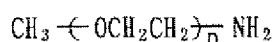
5.0 mg/ml (AmB自体の溶解度の約10,000倍に相当)とすることができる。

【0037】上記のように、本発明に従う薬物含有ポリマーミセルを凍結乾燥後、再度水溶液に溶解（再構成）した場合でも、ポリマーミセルの形態は完全な状態に維持されており、そのコアからの薬物放出挙動も凍結乾燥前のものと実質的な変化はみられない。また、このようなミセルは、10 μg/ml濃度でも、赤血球に対する溶血作用を示さない。

【0038】本発明で使用されるブロックコポリマーは、それ自体既知の方法に従って、製造することができる[たとえば、M. Yokoyama, et al., Bioconjugate Chem. 3 (1992) pp. 291-301参照]。具体的には、予め製造したα-メチル-ω-アミノ-PEO:

【0039】

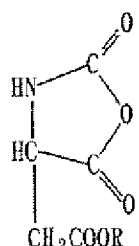
【化8】



【0040】をイニシエーターとし、対応するアスパラギン酸β-エステルのN-カルボキシ酸無水物(NC A):

【0041】

【化9】



【0042】(Rは、アルキルもしくはアラルキル基を示す。)を反応させることにより得ることができる。

【0043】一方、アミノ酸ブロックとしてポリ(γ-アラルキルもしくはアラルキル-L-グルタメート)をもつブロックコポリマーは、例えばZ. Hruska et al., Polymer 34 (1993) p. 1333-1335に記載の方法またはその改良方法に従って得ることができる。

【0044】上記で提供される薬物含有ポリマーミセルはそれらを有効成分とする医薬製剤に調製することができる。たとえば、非経口投与用として調製する場合は、薬物含有ポリマーミセルを、必要により等張性やpHを調節するために糖類や、生理学的に許容される緩衝剤を加えた生理食塩水に溶解もしくは分散させてもよい。さらに、必要により、野菜油(オリーブ油、ひまし油、ごま油等)をこのような溶液製剤を静脈注射する場合には、患者の年齢、体重、疾患の状態に応じ、医師等の専門家によって総用量が決定されるが、通常、AmBレベルで50~100 μg/mlの溶液として投与される。

また、このような溶液製剤は、凍結乾燥された薬物含有ポリマーミセルを、使用の時期に合わせて溶液に再構成したものであってもよい。経口投与剤は、特に凍結乾燥された薬物含有ポリマーミセルを、必要により経口投与剤の調製に常用されている希釈剤もしくは賦形剤と混合して調製することができる。このような経口投与剤は錠剤、カプセル、顆粒剤等に調製することができ、その際使用できる賦形剤としては、たとえば充填剤および増量剤として、澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよびケイ酸など、結合剤としてカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチンおよびポリビニルピロリドンなど、湿潤剤として、グリセロールなど、崩壊剤として、寒天-寒天、炭酸カルシウムおよび炭酸ナトリウムなど、吸収剤としてカオリンおよびベントナイトなど、ならびに潤滑剤として、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムおよび固体状ポリエチレングリコールなどを挙げることもできる。

【0045】

【実施例】以下、薬物としてAmBを、ポリマーとしてPEO-PBLAを使用して調製したポリマーミセルの具体例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものでない。

【0046】例1: AmB含有PEO-PBLAミセルの調製

(1) この例で使用される上記式(1)で表されるPEO-PBLAは、M. Yokoyama, et al., Bioconjugate Chem. 3 (1992) pp. 291-301に記載の方法に従って製造したものであって、それぞれPEOブロックが12,000 g/molであり、PBLAブロックが3,000 g/molである分子量であった。

【0047】PEO-PBLA(20mg)を4.0 mlのジメチルホルムアミド(DMF)に加温下(40℃)で5分間かけて溶解してポリマー溶液とした。所定量のAmB(Dumex, Denmark)を前記ポリマー溶液に加え、攪拌して溶解した。この溶液を蒸留水(pH=11.3に調節)2Lに対して3回透析した(Spectra-por, MWCO 12,000~14,000 g/mol使用)。透析時間は40時間であった。その後、透析媒体を1.0N HClでpH5.6に中和した。透析バッグ中の等張性はデキストロースで調節した。透析バッグ中の溶液を取り出し、0.22 μmフィルターで濾過し、4℃に貯蔵した。

【0048】(2) 凍結乾燥ポリマーミセルの調製
上記(1)の透析の代わりに、等張性を調節することなく透析を行い、次いで0.22 μmフィルターで濾過した後、凍結乾燥したこと以外、例1の操作をくり返した。

【0049】上記透析工程の概念図を図1に示す。

【0050】なお、この工程中、PEO-PBLAミセル

ルが自己集成中にAmBの可溶化が起こり、透析を通してDMFがアルカリ水溶液で交換される。水溶液をpH 11.3に保持することにより取り込まれ方が不完全なAmBはイオン化され、透析によって除去される。使用するAmBの初期量を2.0mgおよび4.0mgとした場合、PEO-PBLAミセルはAmBを、それぞれ5

7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および141 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルで可溶化した。収率、その他のデータを下記表1にまとめて示す。

【0051】

【表1】

表1

PEO-PBLA (mg)	AmB (ng)	AmBの レベル ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	取り込まれ たAmB量 (μg)	収率 (%)	AmB/ PEO-PBLA のモル比
20	2.0	57	540	27	0.4 *
20	4.0	141	1220	30	1.0 **

* AmB/PEO-PBLAの重量% : *2.7、**6.1

【0052】例2：AmB含有PEO-PBLAミセル溶液のUV/VISスペクトルの吸収

上記例1(1)で調製したAmB含有PEO-PBLAミセルの水溶液(0.024重量/重量%)およびFungizone(商標)(0.00215重量/重量%)をSpectronic 3000紫外可視分光光度計(Milton Ray)で測定したスペクトログラムを図2に示す。Fungizoneが低波長側に主要吸収を有するのに対し、AmB含有PEO-PBLAミセル溶液は、今まだ高波長側に主要吸収を有し、AmBは自己会合していないことが確認できる。

【0053】例3：PEO-PBLAミセルの透過型電子顕微鏡(TEM)による検討

PEO-PBLAミセルの逆染色法を略記すれば、次のとおりである。PEO-PBLAミセル溶液(約1.0mg/ml、水中)の1滴を膜被覆されたグリッド上に置いた。過剰の液体をグリッド表面から濾紙(Whatman, No. 1)を用いて除去した。すぐさま、1%リンタングステン酸の1滴を前記表面に加えた。1分後、過剰の液体を除去し、表面を通気乾燥し、グリッドを透過電子顕微鏡(Hitachi H7000)に装填した。18,000倍の倍率(75kV)で写真をとった。TEMはポリマーミセルとしてナノ範囲のコロイドを解像できる。上記写真を図3に示す。写真は球形のPEO-PBLAを明らかに示し、ポリマーミセルに対する初期の動的光散乱法の結果と整合する。PEO-PBLAミセルの平均直径は、TEM写真中のポリマーミセル100個を無作為に選択し、直接測定した結果の平均値である。薬剤を含有しないミセルと薬剤を含有するミセルの平均直径は、それぞれ $20.0 \pm 3.9\text{nm}$ と $25.8 \pm 4.2\text{nm}$ であった。これらのPEO-PBLAミセルのサイズ分布は、極めて狭いことがわかる。ポリマーミセルとは独立に、AmB自体(PEO-PBLAを使用しない)のミセルを、上記透析法で得たが、これらのミセルの平均直

径は $12.9 \pm 2.4\text{nm}$ であった。

例4：AmBによる溶血性

雄のスプレーグ・ドウレイ(Sprague-Dawley)ラットから、予め酸性クエン酸デキストロースを満していたシリンジを用い、心臓穿刺により血液を集めた。全血を遠心(2000rpm)し、上清をピペットで除去した。赤血球細胞(RBC)を、等張性PBSで希釈した。これは、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のFungizone(商標)存在下において、576nmの吸光度が0.40を示す。

【0054】37℃において、100ストローク/分の水浴中で30分間、各濃度のAmBとRBC溶液(5.0ml)をインキュベートし、溶血性を試験した。溶血は低温(℃)にすることにより停止し、次いで溶解されていないRBCを20秒間遠心して除去した。上清を集め、576nmにおけるUV/VIS分光法でヘモグロビンについて分析した。溶血されたRBCの百分率は、次の式

$$\text{溶血}(\%) = 100 \times (A_{bs} - A_{bs_0}) / (A_{bs_{100}} - A_{bs_0})$$

上等式中、 A_{bs} 、 A_{bs_0} および $A_{bs_{100}}$ は、それぞれ試料、AmB不含対照および20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のFungizone(商標)の存在下の対照である。

【0055】結果：PEO-PBLA中に閉じ込めたAmBは、AmBレベルが10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でさえも、AmBの溶血作用を劇的に低下する。デオキシコール酸ナトリウムでAmBを可溶化した場合[Fungizone(商標)]、AmBは強い溶血性を示し、約3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルで100%溶血に到る(図4参照)。AmBミセルは、デオキシコール酸ナトリウムが共存しないため、Fungizone(商標)より若干溶血が少ない。PEO-PBLAミセル中に閉じ込めたAmBは、30分を超え、5.5時間目でも、3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルでは全く溶血を起こさなかった。このことは、PEO-PBL

AミセルからのAmBの放出が遅いことを示す(図5)。AmBが閉じ込められたPEO-PBLAミセルは、AmB/PEO-PBLAのモル比が0.40および1.0のいずれにおいても溶血作用を示していない(図5)。

【0056】PEO-PBLAミセルからのAmBの放出が遅いことは、それらのコアが固体のような性質を示すことに起因する可能性がある。また、溶血作用を欠くことは、PEO-PBLAミセルからの単量体性AmBの放出を反映している可能性もある。単量体性AmBは、凝集された状態のAmBより溶血性が低いことが知られている(前記 J. Brajtburg et. al., 参照)。なお、AmB/PEO-PBLAのモル比が1.0を超え

ると、Fungizone(商標)のような溶血性を示す。一方、担体に用いるPEO-PBLAミセルは、0.70 mg/mlのレベルでさえも、全く溶血を起こさない(図6)。

【0057】<凍結乾燥されたAmB含有PEO-PBLAミセルの特性>例1(2)で得られたAmB含有PEO-PBLAミセル(なお、「含有」および「充填」は「閉じ込められた」と互換可能に使用している)は、水溶液に数秒以内で溶解する。PEO-PBLAおよびAmBの溶解性ととともに、表I Iにまとめて示す。

【0058】

【表2】

表II 凍結乾燥されたAmB含有PEO-PBLAミセルの性質

PEO-PBLA (mg)	AmB (mg)	外観	再構成 時間 (秒)	AmBの 含有率 (%)	AmBの 溶解度 (mg/ml)	平均 直径 (nm)
20	2	黄色粉末	<2	1.23	>5.0	
20	4	黄色粉末	<2	3.82	>5.0	27.9±3.1

【0059】溶液中の高AmBレベル(5.0 mg/mlにおいて)は、AmBの溶解度の10,000倍を示すので、上記ミセルは、水溶液に対する溶解度は、AmB自体の10,000倍以上である。また、これらのミセルのTEM写真を図7に示す。これらのサイズ分布もまた、AmB含有PEO-PBLAミセルの二次凝集が起こっていないことを示す。

【0060】例5: AmBの抗真菌活性

ブロス希釈法により、AmB(比較)、Fungizone(商標)(比較)、AmB含有PEO-PBLAミセルおよびPEO-PBLAミセル(対照)の下記表I I Iに示す菌に対する抗菌活性を測定した。結果を最小阻止濃度で示す。

【0061】

【表3】

表Ⅲ：最小阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

被 験 菌	試 料			
	AmB	Fungizone	本発明の* ミセル	PEO-PBLA ミセル
キャンディダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) ATCC 14053	2.5	2.5	0.63	—
アスペルギルス・ニガー (<i>Aspergillus niger</i>) PLM 1140	5	2.5	0.31	—
クリプトコッカス・ネオホルマンズ (<i>Cryptococcus neoformans</i>) KF-33	0.63	0.63	0.08	—
サッカロミセス・セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) PLM 454	0.63	0.63	0.16	—

* AmB/PEO-PBLA=1.0 (モル比)

【0062】本発明のAmB含有PEO-PBLAミセルは、AmBの抗菌活性に悪影響を及ぼすことなく、むしろその活性を高めることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【図1】透析によるAmB含有PEO-PBLAミセルの調製工程の概念図である。

【図2】例1(i)で調製したAmB含有PEO-PBLAミセルの水溶液およびFungizoneのUV/VISスペクトラムを示す図である。

【図3】AmB含有PEO-PBLAミセル(粒子)の透過型電子顕微鏡(TEM)図に代わる写真である(上部)。下部は、PEO-PBLAミセル(白丸)、AmB含有PEO-PBLAミセル(四角)およびAmBミセル(黒丸)のサイズ分布を示すグラフである。

【図4】Fungizone(黒ひし型)、AmBミセル(四角)およびAmB含有PEO-PBLAミセル(丸)としての各種AmBレベルにおけるラット赤血球細胞(R

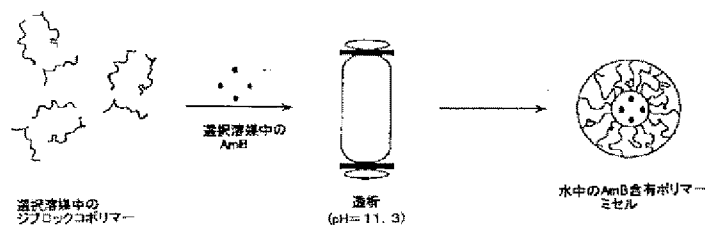
BC)の溶血性を示すグラフである。AmB含有PEO-PBLAミセルのAmB/PEO-PBLAは0.40(モル比)である。

【図5】FungizoneおよびAmB含有PEO-PBLAミセルのAmB $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ レベルでの経時的なラットRBCの溶血性を示すグラフである。後者のAmB/PEO-PBLAのモル比は、0.4および1.0である。

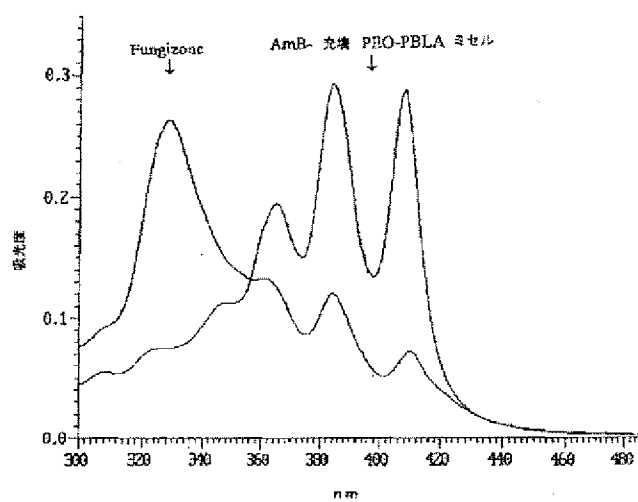
【図6】PEO-PBLA、FungizoneとしてのAmBおよびデオキシコール酸ナトリウムの各種レベルにおけるラットRBCの溶血性を示すグラフである。

【図7】凍結乾燥粉末を再構成した後のAmB含有PEO-PBLAミセル(粒子)のTEM図に代わる写真である(上部)。下部は、凍結乾燥前のAmB含有PEO-PBLAミセルのサイズ分布(黒丸)と凍結乾燥のそれら(白丸)のサイズ分布を示すグラフである。

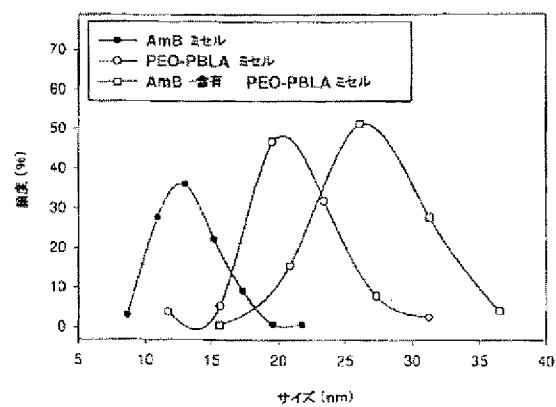
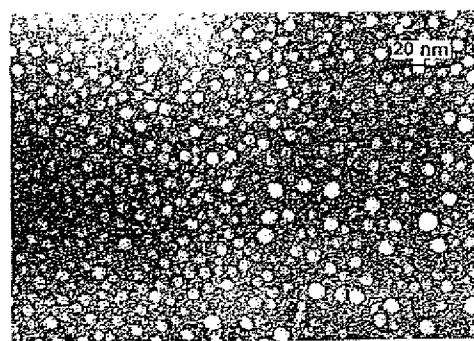
【図1】



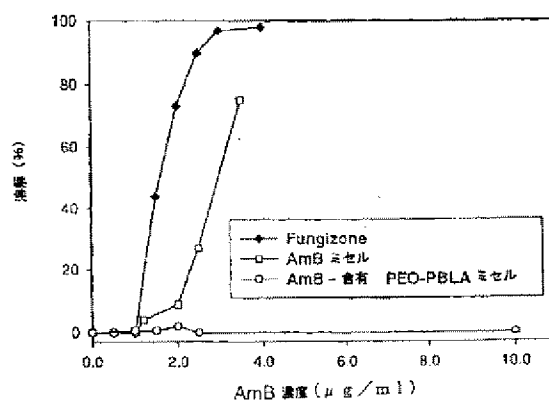
【図2】



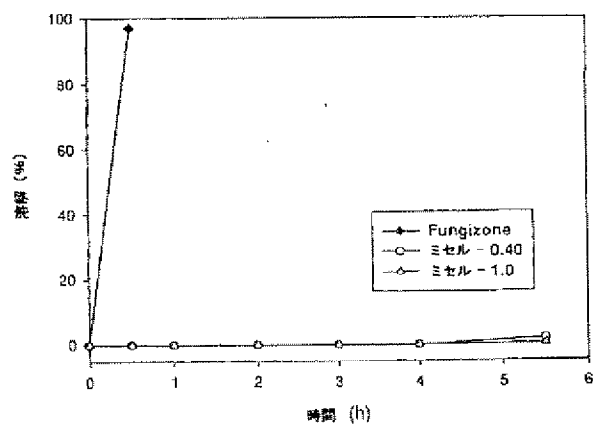
【図3】



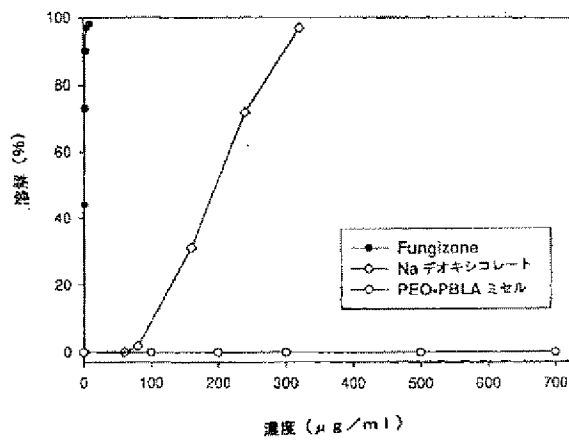
【図4】



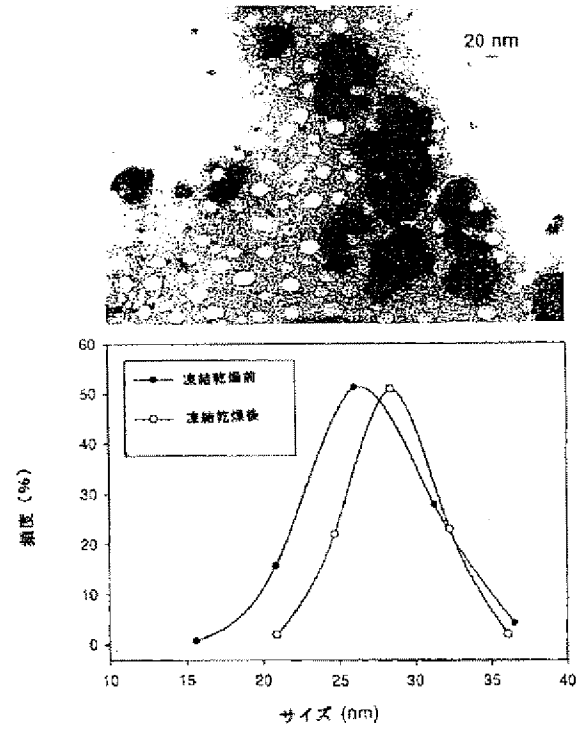
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 ボング・ヨー
 アメリカ合衆国ウイスコンシン州53719マ
 デyson・モレイnビュードライブ305
 1124

Reference 6

POLYMER MICELLE-CONTAINING MEDICINE AND ITS MEDICINAL PREPARATION

Publication number: JP11100331

Publication date: 1999-04-13

Inventor: KATAOKA KAZUNORI; OKANO MITSUO; GLENN S KWON;
BONG YO

Applicant: NANO CAREER KK

Classification:

- International: A61K9/107; A61K31/70; A61K31/7048; A61K47/30;
A61K47/34; A61K9/107; A61K31/70; A61K31/7042;
A61K47/30; A61K47/34; (IPC1-7): A61K47/30; A61K9/107;
A61K31/70

- European:

Application number: JP19970279941 19970926

Priority number(s): JP19970279941 19970926

Report a data error here

Abstract of JP11100331

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a physically stable polymer micelle capable of reducing the toxicity of a polyene antibiotic, permitting to enhance its content, and useful for medicinal preparations by including the polyene antibiotic in the micelle of a specific block copolymer in a closed state. SOLUTION: This polymer micelle is obtained by including (B) a polyene antibiotic such as amphotericin B in (A) the micelle of a block copolymer [e.g. poly(ethylene oxide)-block-poly (β-benzyl L-aspartate)] selected from poly(ethylene oxide)-block-poly (β-alkyl or aralkyl L-aspartate) polymers and poly(ethylene oxide)-block-poly (γ-alkyl or aralkyl L-glutamate) polymers in a closed state. The component B is preferably used in the form of a monomer and in a molar ratio of the component B to the component A of ≤ 1 mole. The component A preferably has an average particle diameter of 5-1000 nm.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide